



TITLE:

アフリカツメガエルの幼生尾部再生と胚発生における神経栄養因子シグナル経路の機能(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

飯村, 覚

CITATION:

飯村, 覚. アフリカツメガエルの幼生尾部再生と胚発生における神経栄養因子シグナル経路の機能. 京都大学, 2020, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2020-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r13352>

RIGHT:

許諾条件により本文は2021-03-22に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	飯村 覚
論文題目	アフリカツメガエルの幼生尾部再生と胚発生における神経栄養因子シグナル経路の機能		
(論文内容の要旨)			
<p>神経栄養因子は神経細胞の生存や軸索伸長などを制御する分泌因子であり、主にNGF、BDNF、NTF3、NTF4の4種類が知られている。そしてTrk受容体ファミリーに分類されるTrkA、TrkB、TrkCが神経栄養因子の受容体として細胞内にシグナルを伝達する。この神経栄養因子シグナル経路は神経細胞の軸索再生に関与することが報告されているが、尾や付属肢などの組織レベルの再生現象にも関与するかどうかは不明であった。</p> <p>本研究において申請者は、アフリカツメガエルをモデル系として用い、神経栄養因子シグナル経路の組織再生における機能を調べた。アフリカツメガエルの幼生（オタマジャクシ）の尾部は、切断されてもほぼ元通りに再生できることが知られており、組織再生研究の代表的な実験系の一つである。この幼生尾部再生過程は、傷上皮期（細胞が遊走して切断面を覆う）、再生芽期（再生芽と呼ばれる突起が形成される）、再生尾成長期（再生芽が成長して尾となる）の3段階から成る。申請者は、神経栄養因子遺伝子のうち<i>ngf</i>と<i>bdnf</i>の発現量が、傷上皮期から再生尾成長期にかけて顕著に増加することを見出した。さらに空間的な発現パターンを解析した結果、再生芽期と再生尾成長期において<i>ngf</i>が内鰭外鰭境界領域、<i>bdnf</i>が脊索先端周辺の間葉細胞に発現することを見出した。また、Trk受容体ファミリー遺伝子についても空間的な発現パターンを解析したところ、<i>TrkB</i>や<i>TrkC</i>は特徴的な発現パターンを示さなかったが、<i>TrkA</i>は再生芽や再生尾の脊索に強く発現していた。これらの結果、およびTrkAがBDNFではなくNGFの受容体であることから、内鰭外鰭境界領域から分泌されたNGFが脊索のTrkAに結合して、幼生尾部再生を制御する可能性が考えられた。そこで、Trk受容体ファミリーの阻害剤K252aの存在下で幼生尾部再生を誘導したところ、再生尾の短縮が観察された。さらに、このような再生尾の短縮はTrkAの阻害剤GW-441756でも観察されたが、TrkBの阻害剤ANA-12では観察されなかった。したがって、TrkBではなくTrkAが再生尾の伸長に関与することが示唆された。次に、神経栄養因子シグナル経路が神経依存的に幼生尾部再生を制御する可能性を検討したが、K252aの存在下でもコントロールと同様に再生尾に神経管が形成されて軸索が伸長していたので、神経栄養因子シグナル経路は神経非依存的に幼生尾部再生を制御することが示唆された。このことは、<i>TrkA</i>が再生中の脊索（中胚葉由来の組織）に発現するという結果とよく合致している。</p> <p>次に申請者は、再生尾における<i>TrkA</i>の発現パターンが、尾を切断していない幼生における発現パターンとよく一致していたことに注目し、再生過程と通常の発生過程において、TrkAが共通の機能を持つのではないかと考えた。そこで発生過程における発現パターンを調べたところ、原腸胚期の背側中胚葉（将来脊索に分化する）、そして神経胚期の脊索において<i>TrkA</i>が発現していることがわかった。さらに、<i>TrkA</i> mRNAに結合してその翻訳を阻害するモルフォリノオリゴを初期胚にインジェクションしたところ、原腸胚期では卵黄栓の拡大、神経胚期では背側中胚葉のインターカレーションの阻害、尾芽胚期では体長の短縮が観察された。これらの表現型は、原腸陥入およびその後の体軸伸長の阻害に起因する典型的なものである。</p> <p>以上の本研究の結果から、アフリカツメガエルの幼生尾部再生と初期胚発生の両方において<i>TrkA</i>が背側中胚葉（脊索）に発現し、尾などの体軸組織の構築において重要な役割を担うことが示唆された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

アフリカツメガエルの幼生は、尾部を切断されてもほぼ完全な機能と形態を持つ新たな尾部を再生する能力を持っており、組織再生研究のモデル系としてよく用いられる。本研究において申請者は、神経細胞の生存や軸索伸長を制御することで古くから知られている神経栄養因子シグナル経路に着目し、そのアフリカツメガエル幼生尾部再生過程への関与を検討した。

申請者はまず、4種類の神経栄養因子遺伝子 (*ngf*、*bdnf*、*ntf3*、*ntf4*) のうち、*ngf*と*bdnf*が幼生尾部再生過程において顕著な発現上昇を示すことを見出した。さらに空間的な発現変化を解析した結果、尾の切断後2、3日で形成される再生途中の組織(再生芽と呼ばれる)において、*ngf*は内鰭外鰭境界領域、*bdnf*は脊索先端周辺の間葉細胞にそれぞれ強く発現することを見出した。一方、神経栄養因子受容体遺伝子の空間的な発現変化を解析したところ、NGF受容体遺伝子*TrkA*は再生芽の脊索に強く発現していたが、BDNF/NTF4受容体遺伝子*TrkB*やNTF3受容体遺伝子*TrkC*は再生芽において発現がほとんど見られなかった。以上の結果からNGF/*TrkA*シグナル経路が幼生尾部再生に関与する可能性が考えられた。そこで神経栄養因子受容体の阻害剤を用いて検討したところ、汎*Trk*阻害剤K252aもしくは*TrkA*阻害剤GW-441756によって再生尾の伸長が阻害されることを見出した。一方、再生尾における神経管形成はK252aやGW-441756によって殆ど影響を受けなかった。以上の結果より、主に神経系で機能することが知られていたNGF/*TrkA*シグナル経路が、アフリカツメガエル幼生尾部再生過程において中胚葉系の組織である脊索で機能し、神経非依存的なメカニズムによって再生尾を伸長させることが示唆された。

次に申請者は、幼生尾部再生過程だけでなく初期胚発生過程においても、NGF/*TrkA*シグナル経路が尾などの体軸組織の伸長を制御するのではないかと考えた。そこで初期胚発生過程における*TrkA*の発現パターンを調べたところ、原腸胚および神経胚期の背側中胚葉(脊索)に発現が観察された。さらに、モルフォリノオリゴを用いて初期胚の*TrkA*をノックダウンしたところ、原腸陥入および体軸の伸長が阻害され、尾芽胚の体長が著しく短縮した。したがって、初期胚発生と幼生尾部再生の両方において、*TrkA*が脊索に発現して体軸の伸長を促進する役割を持つことが示唆された。

以上のように本論文は、アフリカツメガエルの初期胚発生および幼生尾部再生における神経栄養因子シグナル経路の重要性を明らかにしたものであり、生命科学に関する高度で幅広い学識、発生および再生生物学分野における優れた研究能力、そして生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見もしくは概念等が示されており、論理的かつ一貫性を持って記述されている。よって博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。更に、令和2年1月30日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行ない、申請者の実験結果およびその解釈について議論すると共に、研究背景となる学識について特に再生生物学に重点をおいて質疑応答を行なった。その結果、申請者を合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日